

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/485

A61K 31/52

A61K 38/21

A61K 45/06

A61P 31/12

A61P 31/16



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03804954.6

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1638772A

[22] 申请日 2003.1.30 [21] 申请号 03804954.6

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 31 [33] AU [31] PS0228

[86] 国际申请 PCT/AU2003/000093 2003.1.30

[87] 国际公布 WO2003/063869 英 2003.8.7

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.31

[71] 申请人 皮科莱尔控股公司

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 D·A·安德森 E·V·加兹纳

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 唐晓峰

权利要求书 7 页 说明书 23 页 附图 6 页

[54] 发明名称 抗病毒化合物

[57] 摘要

本发明涉及通常可用于改善与病毒感染相关的症状的化合物。更明确的, 本发明涉及化合物的用途, 其中, 该化合物对细胞上或细胞内的膜结构和/或跨膜结构具有生理学效果, 并且, 该化合物能直接或间接地减少或抑制或预防病毒感染、处理和/或从细胞中释放。进而更明确的, 本发明着眼于一种或多种化合物的应用, 这些化合物可在预防、治疗和/或症状性缓解脊椎动物, 特别是人类的病毒感染中, 对至少一种宿主细胞的离子通道进行调节。这些化合物可单独, 或者与其它化合物诸如能阻断、抑制或至少损伤离子通道流动的化合物联合提供。本发明一项优选的具体实施方式是上述抗病毒化合物在治疗性处理包括人类的脊椎动物以预防、减少或治疗由某些小核糖核酸病毒科病毒病原体, 诸如但不限于鼻病毒属或肠道病毒属种类引起的感染中的应用。

知识产权出版社出版

ISSN 1000-8427 4

## 抗病毒化合物

### 发明背景

### 技术领域

本发明涉及通常可用于改善与病毒感染相关的症状的化合物。更明确的，本发明涉及化合物的用途，其中，该化合物对细胞上或细胞内的膜结构和/或跨膜结构具有生理学效果，并且，该化合物能直接或间接地减少或抑制或预防病毒感染、处理和/或从细胞中释放。进而更明确的，本发明着眼于一种或多种化合物的应用，这些化合物可在预防、治疗和/或症状性缓解脊椎动物，特别是人类的病毒感染中，对至少一种宿主细胞的离子通道进行调节。这些化合物可单独，或者与其它化合物诸如能阻断、抑制或至少损伤离子通道流动的化合物联合提供。本发明一项优选的具体实施方式是上述抗病毒化合物在治疗性处理包括人类的脊椎动物以预防、减少或治疗由某些小核糖核酸病毒科病毒病原体，诸如但不限于鼻病毒属或肠道病毒属种类引起的感染中的应用。

### 现有技术说明

在本说明书中涉及到作者的出版物的著录项目集合在说明书末尾进行说明。

在此说明书中任何现有技术的引用不能也不应当被认为是承认或任何形式地暗示此现有技术在任何国家中构成常识的一部分。

治疗病毒病原体药物的开发很多年来都是世界健康研究者的目标，但是，尽管对此工作非常关注，人们仍需要有效的抗病毒药物用于有效的治疗大量的病毒介导性疾病。

在寻找可有效的抑制宿主机体内病毒散播的药物的过程中，遇到了许多问题。简单的说，这些问题包括：许多病毒有能力避免激活免疫系统的检测机制、病毒有在被免疫系统检测到之前进行复制和散播的能力、以及很高的病毒蛋白质突变率。

小核糖核酸病毒科是一群普遍存在的病毒病原体，并引起多数常见、且常常是严重的人类病毒介导性疾病。由此科病毒引起的疾病包括无菌性脑膜炎、脊髓灰质炎、某些类型的心肌炎以及鼻病毒属感染。所有急性鼻咽炎(普通感冒)中，鼻病毒导致了超过80%的疾病[Monto等人，临床治疗<Clin. Ther. >10 : 1615-27, 2001]，由此，这是导致造成最限制活动的一种呼吸性感染的原因，并且造成了西方国家每年大量的医生会诊。

小核糖核酸病毒科同样也具有兽医学意义：口疮病毒属是造成最近大量家养动物破坏性的口蹄疫的主要原因。

由此，由于其感染人类和家养动物等动物的能力，此类病原体导致了世界上显著的大量的易患病倾向。

伴随着治疗鼻病毒和其它类型的小核糖核酸病毒感染的特定的目的，人们开发了新药物，诸如普来可那立，但是这些药物的显著的一个缺点是，有可能形成普来可那立-抵抗性病毒株(Turner, 抗病毒研究<Antiviral Res.> 49 (1) : 1-14, 2001)。这是由于病毒具有强的突变并克服抗病毒化合物效果的能力，这些化合物原先被设计成能抑制病毒进入宿主细胞并随后在细胞内进行复制中的一项或多项步骤。

研究发现，由某些小核糖核酸病毒科病毒引起的感染会导致感染细胞中细胞内离子水平的改变。更明确的说，脊髓灰质病毒和柯萨奇肠道病毒导致细胞间质中钙浓度的增加(Irurzum等人，病毒杂志<J. Virol>. 69 (8): 5142-6, 1995 ; van Kuppeveld等人，EMBO J. 16 (12) : 3519-32, 1997)，并且人们发现脑脊髓炎病毒感染和脊髓灰质病毒感染都可以打破细胞的钙和钾离子的平衡(Egberts等人，病毒杂志<J. Virol>. 22 (3).- 591-7, 1977 ; Nair, 病毒杂志<J. Virol>. 37(1): 268-73, 1981; Nair等人，病毒杂志<J. Virol>. 31 (1) : 184-9, 1979)。这些离子转运中变化的净结果似乎导致了钠和/或钙离子涌入到细胞质中。

根据本发明，化合物被鉴定为能改变宿主细胞离子通道的通透性，并且，出乎意料的，人们发现，这些化合物可有效的控制病毒，更明确

的是小核糖核酸病毒科的复制和/或传播。

### 发明概述

纵观说明书，除非文中需要其它说明，词汇“包括”或同义词，应当理解为意味着包括所述元素或整体或元素或整体的组合，但不排除任一其它的元素或整体或元素或整体的组合。

本发明提供了一种治疗或预防脊椎动物，诸如但不限于人类、家养动物、禽类、宠物和实验室试验动物的病毒感染的方法。通常的，化合物定义为具有调控允许离子进出脊椎动物细胞的膜结构或跨膜结构的能力。

在一项优选实施方式中，这些膜结构或跨膜结构指的是离子通道，优选的化合物通认为是“离子通道阻断剂”或“离子通道调节剂”。所述化合物具有尤其是改变离子通道的功能性特质，诸如创造开放的离子状态(完全激活)、部分激活、抑制或完全阻断离子通道的特质。

本发明所关注的化合物如此文所定义以式 I 至 IV 表示。优选的化合物维拉帕米(式 V)、益康唑(式 VI)、苯扎明(式 VII)和 5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[EIPA] (式 VIII)和阿米洛利(式 IX)、EIPA 的母体化合物。所有这些化合物的参考包括其药盐以及其衍生物。

化合物可以单独的或彼此结合或者与其它具有抗病毒、离子通道-阻断性质的化合物或者其它可促进病毒感染症状改善的化合物相结合给药。

因此，化合物可以含化合物和一种或多种药学可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物的形式存在。

病毒通常为小核糖核酸病毒科的病毒，诸如但不限于鼻病毒属或肠道病毒属的种。

在一项优选的实施方式中，化合物在一段时间内并在足以改善病毒感染症状或预防或减少病毒感染的条件下给予患者。

本发明进一步的提供了通式 I-IV 的化合物，更具体的是维拉帕米、益康唑、苯扎明和/或 EIPA 及其母体化合物阿米洛利在制备治疗或预防脊椎动物诸如人的病毒感染的药物中的用途。EIPA 和维拉帕米被认为



是对鼻病毒是特别有效的。阿米洛利和苯扎明对于肠道病毒是特别有效的。

本发明中“化合物”的参考表示式 I-IV 的通式化合物以及式 V-IX 的特定的化合物。术语“化合物”同时还包括“化学试剂”以及“治疗剂”和“活性成分”和“活性剂”。

#### 附图说明

图 1 图解表示 5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[EIPA]对 Rhino 2 病毒的生产和海拉(Hela)细胞的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)对照 EIPA (以 μM 计)的浓度来测定。

图 2 图解表示维拉帕米对 Rhino 14 病毒的生产和海拉细胞代谢的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)根据 EIP (以 μM 计)的浓度来测定。

图 3 图解表示 EIPA 对 Rhino 2 病毒生产和海拉细胞的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)根据维拉帕米(以 μM 计)的浓度来测定。

图 4 图解表示维拉帕米对 Rhino 14 病毒的生产和海拉细胞的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)根据维拉帕米(以 μM 计)的浓度来测定。

图 5 图解表示阿米洛利对柯萨奇肠道病毒 B3 的生产和海拉细胞的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)根据阿米洛利(以 μM 计)的浓度来测定。

图 6 图解表示苯扎明对柯萨奇肠道病毒 B3 的生产和海拉细胞的影响。病毒生产(-Δ-)和细胞代谢(-o-)根据苯扎明(以 μM 计)的浓度来测定。

#### 发明详述

本发明部分的提供了能对细胞上或细胞内的膜结构或跨膜结构产生作用以降低病毒病原体毒性的化合物在预防、治疗和/或症状性缓解脊椎动物特别是人类的病毒感染上的用途。脊椎动物包括家养动物、禽类、宠物、实验室试验动物以及人类。特别优选的是人类。

文中的术语“毒性”包括病毒在宿主细胞中进行处理以生产病毒颗粒

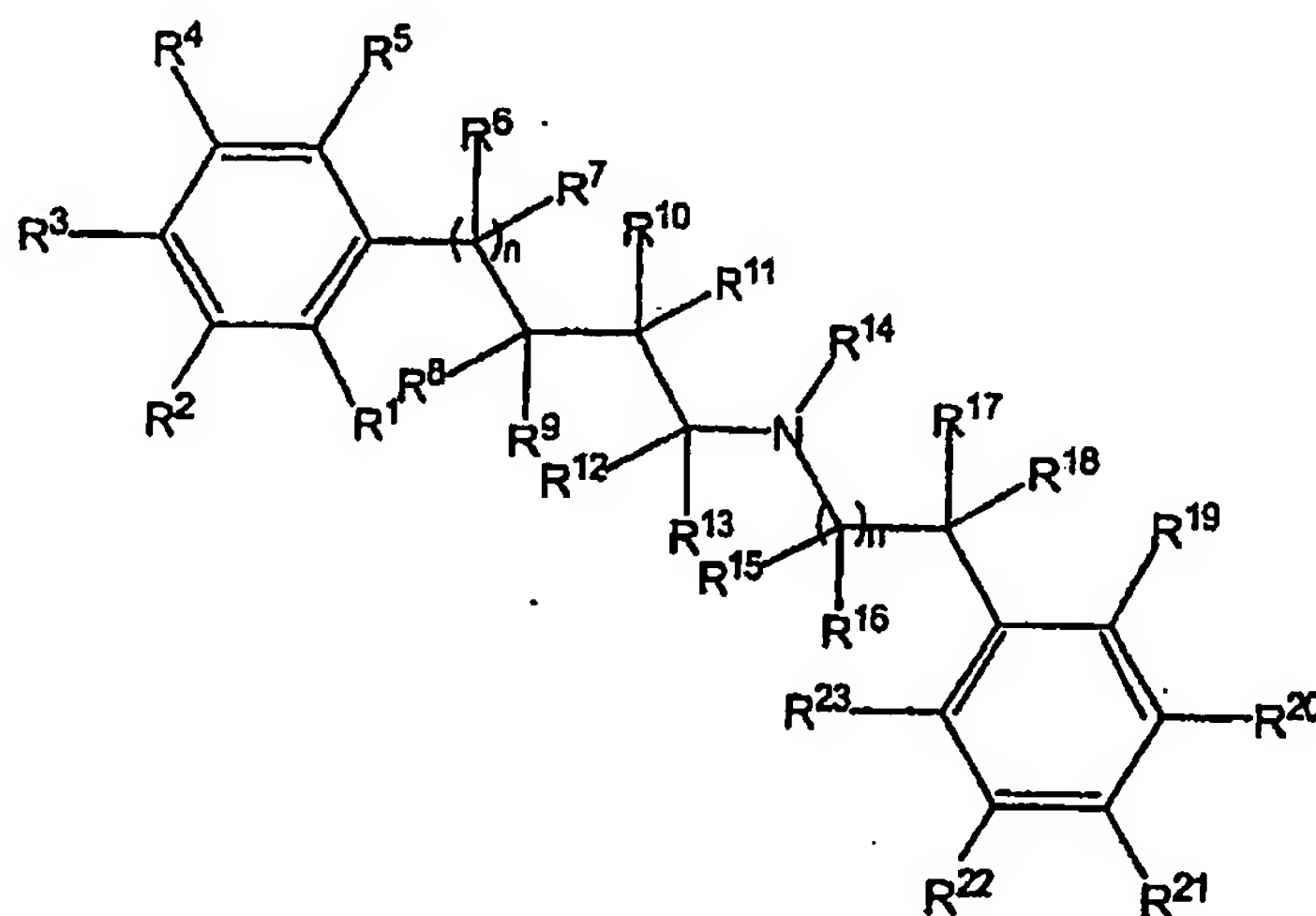
粒的能力。

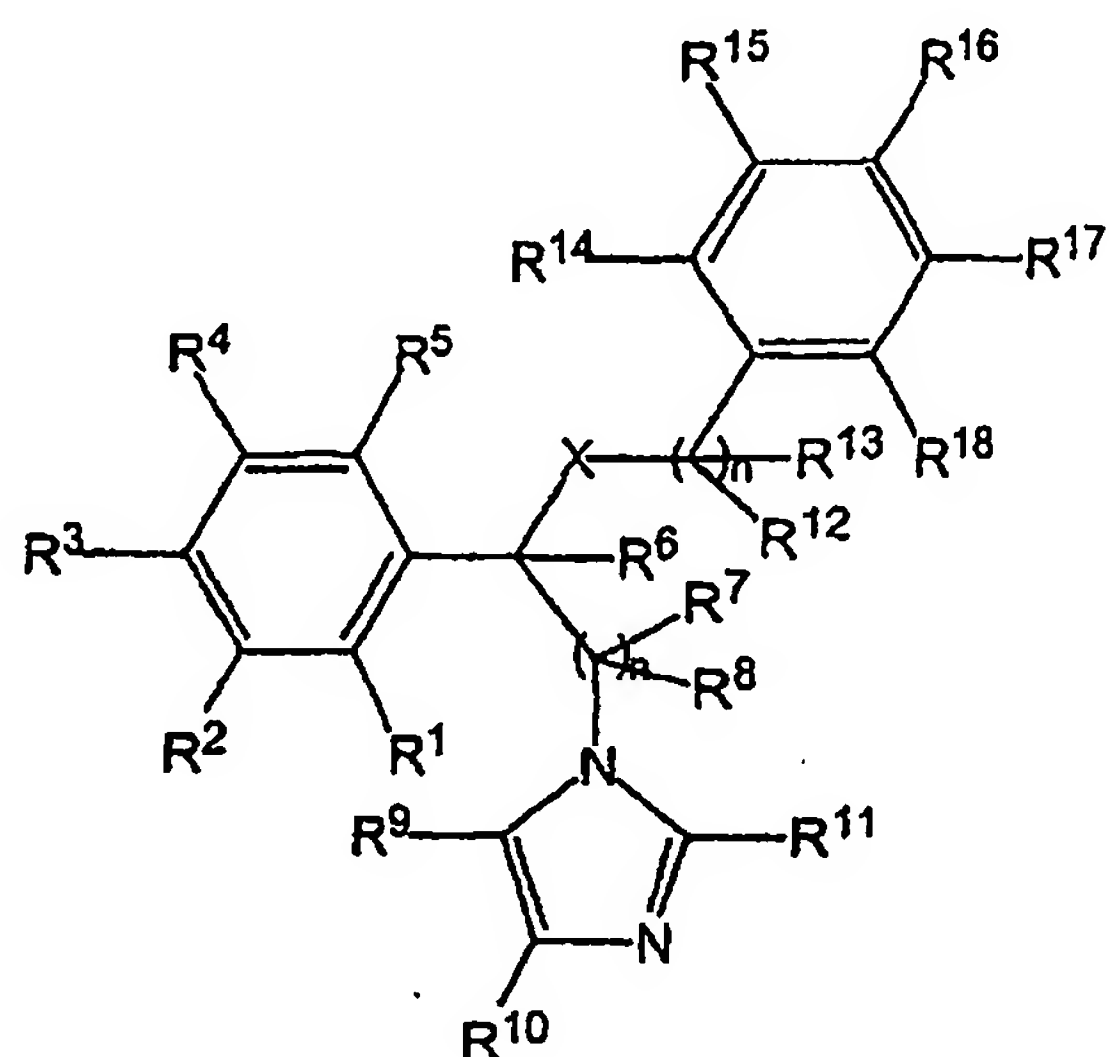
术语“处理”包括病毒颗粒或病毒核酸分子粘附在细胞上或渗入细胞内、病毒核酸复制、病毒衍生的蛋白的合成、以及病毒颗粒的组装和释放。

术语“病原体”包括任一种能导致或至少能促进一定程度的能诱导感染症状的感染的，无论通常被认为是病原体或不被认为是病原体的病毒。

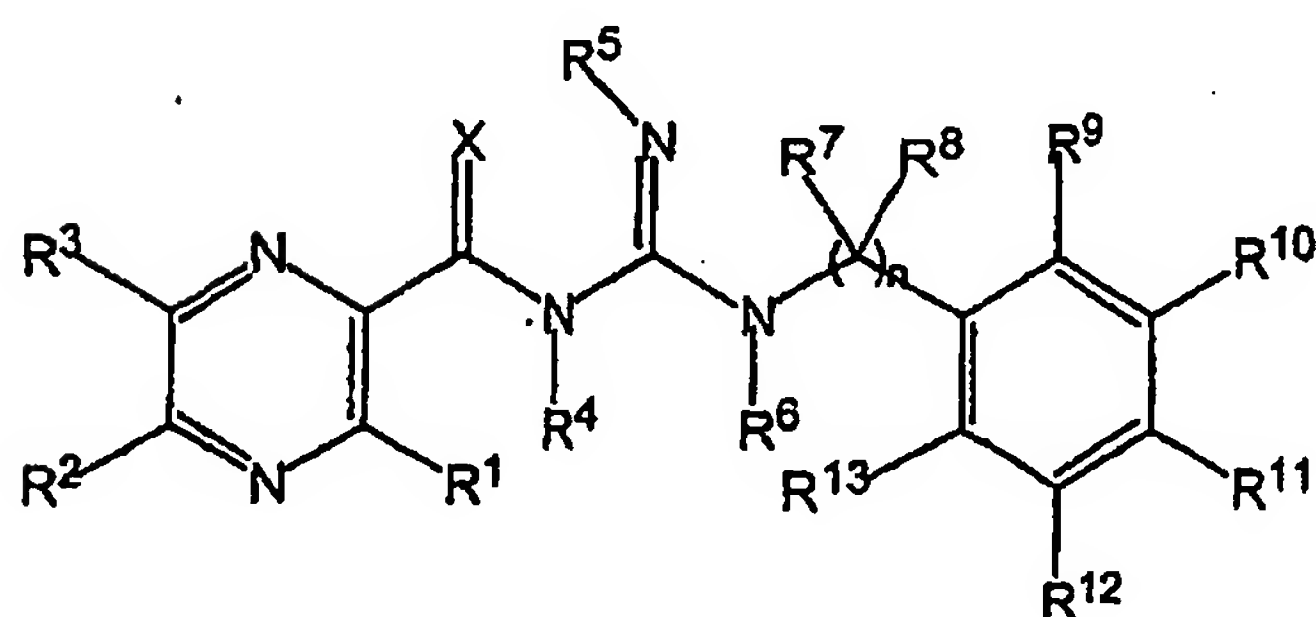
“症状”包括可见的症状，诸如健康不良、或感染的体征、或由诸如免疫学测试所确定的感染。

相应的，本发明的一个方面关注改善在脊椎动物中小核糖核酸病毒感染效果的方法，所述方法包括向所述动物给予有效量的一种或多种选自式 I-IV 化合物或其母体的化合物：

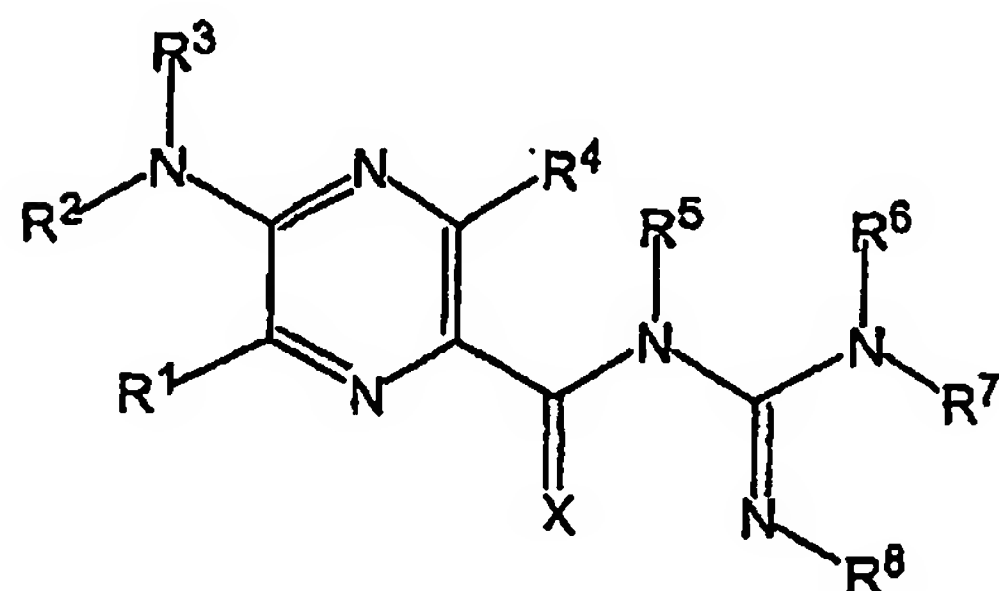




II



III



IV

其中,  $n$  是 0-10 个原子,  $n$  和  $X$  都可以是相同或不同的, 且每一原子都选自碳、氧、氮、硫、磷、硅、硼、砷和硒;

$R_1$  至  $R_{23}$  可以相同也可以不同, 且每个都选自氢、F、Cl、Br、I、CN、NC、NO<sub>2</sub>、CF<sub>3</sub>、COR<sub>1</sub>、CO<sub>2</sub>R<sub>1</sub>、OR<sub>1</sub>、SR<sub>1</sub>、NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、N(=O)<sub>2</sub>、NR<sub>1</sub>OR<sub>2</sub>、ONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、SOR<sub>1</sub>、SO<sub>2</sub>R<sub>1</sub>、SO<sub>3</sub>R<sub>1</sub>、SONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、SO<sub>3</sub>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>、P(R<sub>1</sub>)<sub>3</sub>、P(=O)(R<sub>1</sub>)<sub>3</sub>、Si(R<sub>1</sub>)<sub>3</sub>、B(R<sub>1</sub>)<sub>2</sub>、(C=X)R<sub>1</sub> 或 X(C=X)R<sub>1</sub>, 其中,  $X$  选自硫、氧和氮; C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>

烷基(支链和/或直链)、 $C_1-C_{20}$ 芳烷基、 $C_3-C_8$ 环烷基、 $C_1-C_{10}$ alldoxy、 $C_1-C_{10}$ 烷基羰基、 $C_6-C_{14}$ 芳基、 $C_1-C_{14}$ 杂芳基、 $C_1-C_{14}$ 杂环、 $C_2-C_{10}$ 烯基、 $C_1-C_{10}$ 杂芳基烷基、 $C_1-C_{10}$ 烷氧基烷基、 $C_1-C_{10}$ 卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、卤代烷氧基、 $C_1-C_{10}$ [CN、NC、 $OR_1$ 、 $SR_1$ 、 $NR_1R_2$ 、 $N(=O)_2$ 、 $NR_1OR_2$ 、 $ONR_1R_2$ 、 $SOR_1$ 、 $SO_2R_1$ 、 $SO_3R_1$ 、 $SONR_1R_2$ 、 $SO_2NR_1R_2$ 、 $SO_3NR_1R_2$ 、 $P(R_1)_3$ 、 $P(=O)(R_1)_3$ 、 $Si(R_1)_3$ 、 $B(R_1)_2$ ]烷基；芳基是带有任一含F、Cl、Br、I、 $NO_2$ 、 $CF_3$ 、CN、NC、 $COR_1$ 、 $CO_2R_1$ 、 $OR_1$ 、 $SR_1$ 、 $NR_1R_2$ 、 $N(=O)_2$ 、 $NR_1OR_2$ 、 $ONR_1R_2$ 、 $SOR_1$ 、 $SO_2R_1$ 、 $SO_3R_1$ 、 $SONR_1R_2$ 、 $SO_2NR_1R_2$ 、 $SO_3NR_1R_2$ 、 $P(R_1)_3$ 、 $P(=O)(R_1)_3$ 、 $Si(R_1)_3$ 、 $B(R_1)_2$ ]烷基取代基的 $C_6-C_{14}$ 。杂芳基是噁唑基、噻唑基、噻吩基、呋喃基、1-异苯并呋喃基、3H-吡咯基、2H-吡咯基、N-吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、pyradaziny1、吲哚基、异吲哚基、吲哚基、嘌呤基、二氮杂萘基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,3,4-噁三唑基、1,2,3,5-噁三唑基、1,3,5-三嗪基、1,2,4-三嗪基、1,2,3-三嗪基、氮杂萘基、氧杂环庚三烯基、硫杂环庚三烯基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、硫茛基、异硫茛基、假吲哚基、2-异吲哚基、1,5-氮茛基、吡喃并[3,4-b]吡咯基、异吲唑基、吲哚噁嗪基(indoxaziny1)、苯并噁唑基、氮茛基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹啉唑基、萘啶基、吡啶并[3,4-b]吡啶基、吡啶并[3,2-b]吡啶基、吡啶并[4,3-b]吡啶基。

通常，化合物的给药是在能足以减少病毒复制和/或病毒从暴露于所示化合物中的细胞中释放出来的数量所需的一定时间和一定条件下进行的。另外可选的，或此外可选的，给药是在能减少或改善感染症状所需的时间和条件下进行的。

本发明化合物还可与药学可接受的可相容的抗衡离子，诸如与包括但不限于盐酸、硫酸、醋酸、乳酸、酒石酸、苹果酸和琥珀酸的酸一起形成的盐，一起给药。

如此文中所使用的，术语“烷基”指的是具有特定数量碳原子的直链或支链饱和的、脂族烃基团。术语“卤代烷基”指的是被至少一个卤



素取代的烷基。相似的，术语“卤代烷氧基”指的是被至少一种卤素取代的烷氧基。如此处所述的，术语“卤素”指的是氟、氯、溴、碘。 $C_2-C_{10}$ 炔基或  $C_2-C_{10}$  烯基可包括支链或直链带有芳基和/或杂芳基的基团。

如此文中所述的，术语“芳基”指的是芳香族碳环系，诸如苯基或萘基、蒽基，特别是苯基。适宜的，芳基是含 F、Cl、Br、I、 $NO_2$ 、 $CF_3$ 、CN、 $OR_1$ 、 $COR_1$ 、 $CO_2R_1$ 、 $NHR_1$ 、 $NR_1R_2$ 、 $NR_1OR_2$ 、 $ONR_1R_2$ 、 $SOR_1$ 、 $SO_2R_1$ 、 $SO_3R_1$ 、 $SONR_1R_2$ 、 $SO_2NR_1R_2$ 、 $SO_3NR_1R_2$ 、 $P(R_1)_3$ 、 $P(=O)(R)_3$ 、 $Si(R_1)_3$ 、 $BR_2$ ，的单、二和三取代物的  $C_6-C_{14}$ ，其中的  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_1-R_2$  所定义的相同。

如此文中所使用的，“卤代烷基”同时包括具有特定数量碳原子的支链和直链饱和的脂族烃基团，其上取代有一个或多个卤素（例如  $-C_xF_y$ ，其中  $x=1$  至  $3$ ， $y=1$  至  $(2x+1)$ ）；“aldoxy”代表一种烷基，其中，一些数量的碳原子是通过氧桥与烷基相连接的；“环烷基”包括饱和的环状基团，包括单-、双-或多-环体系，诸如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、adamantyl 和环辛基。环烷基包括“二环烷基”，包括饱和的二环基团，诸如 [3.3.0] 二环辛烷、[4.3.0] 二环壬烷、[4.4.0] 二环癸烷（萘烷）、[2.2.2] 二环辛烷等等。“烯基”包括直链或支链结构的，并在沿着链上的任一稳定位置上具有一个或多个不饱和的碳-碳键，诸如乙烯基、丙烯基等等烯链；“炔基”包括直链或支链结构，并在沿着链上的任一稳定位置上具有一个或多个三碳-碳键，诸如乙炔基、丙炔基等的炔链。“烷基羰基”包括通过羰基与化合物残基在指定位置相连接的具有一定数量碳原子的烷基基团。“烷基羰基氧基”包括连接在羰基上的具有一定数量碳原子的烷基基团，其中，羰基是通过氧原子连接在化合物残基的指定位置上的。

此处所用的“卤素”指的是氟、氯、溴和碘；“抗衡离子”指的是小的、负电荷离子，诸如氯化物、溴化物、氢氧化物、醋酸盐、硫酸盐等等。

此处所使用的术语“取代的”指的是特定原子上的一个或多个氢被所选一定基团替代的情况，同时特定原子的原子价没有超出，且取代的结果是得到稳定的化合物。

此处所用的术语“杂环”、“杂环的”、“杂环系”等指的是具有单环或多个稠合环的并在其中至少一个环上具有至少一个杂原子诸如氮、氧或硫的饱和的、不饱和的或芳香碳环基团(例如,二环、三环或其它相似的桥环系或取代基)。该术语也包括“杂芳基”,其指的是杂环中至少有一个环是芳香环。任一杂环或杂芳基可以是未取代的,或任选被一种或多种上文所定义的基团取代。进而,二-或三环杂芳基基团中可含有至少一个环,其可是完全或部分饱和的。适宜的杂芳基基团包括但不限于噁唑基、噻唑基、噻吩基、呋喃基、1-异苯并呋喃基、3H-吡咯基、2H-吡咯基、N-吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、pyradaziny1、吲哚基、异吲哚基、吲哚基(indoy1)、吲哚基、嘌呤基、二氮杂萘基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,3,4-噁三唑基、1,2,3,5-噁三唑基、1,3,5-三嗪基、1,2,4-三嗪基、1,2,3-三嗪基、氮杂卓基、氧杂环庚三烯基、硫杂环庚三烯基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、硫茛基、异硫茛基、假吲哚基、2-异吲哚基、1,5-氮茛基、吡喃并[3,4-b]吡咯基、异吲唑基、吲哚噻嗪基(indoxaziny1)、苯并噁唑基、氮茴基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹啉唑基、萘啶基、吡啶并[3,4-b]吡啶基和吡啶并[3,2-b]吡啶基、吡啶并[4,3-b]吡啶基。

杂环系包括部分和完全饱和的杂芳基衍生物。杂环系可以通过基团的任一数量的碳原子或杂原子连接到其它基团上,且都可以是饱和的和不饱和的。

我们提出,如式 I-IV 所定义的化合物或其中一种或多种化合物的母体化合物对膜结构和/或跨膜结构诱导产生生理学效果。更明确的,且不把本发明限制在任何理论或行为模式中,式 I-IV 的化合物或其母体化合物被认为能阻断或损害离子通道的功能或活性。该效果可属于术语“离子通道阻断剂”,然而,术语“阻断剂”并不需要完全阻断或阻止离子通道活性。也可使用术语“离子通道调节剂”。

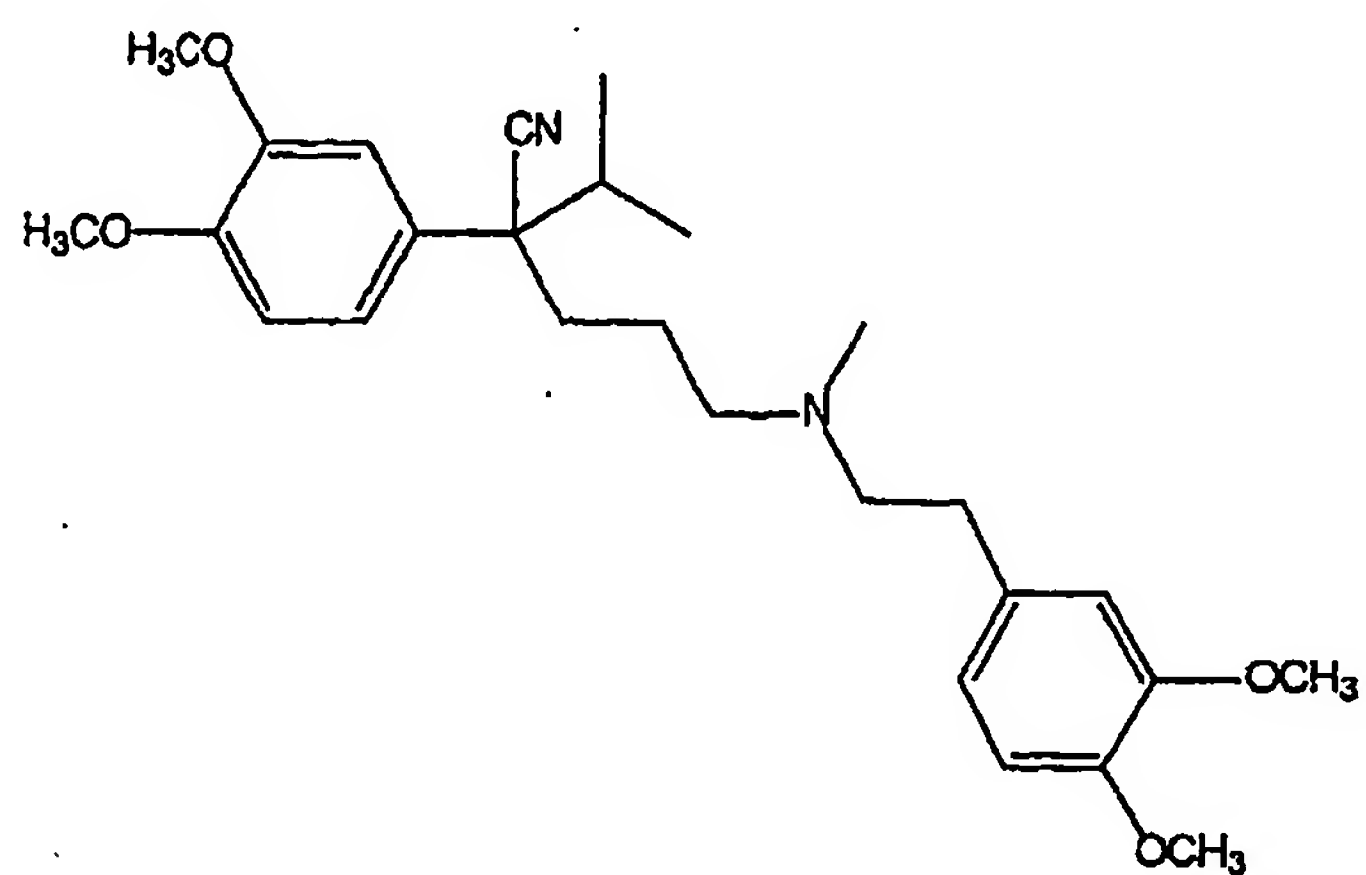
此后的“离子通道”包括但不限于以下膜-结合的离子通道和所有

它们的异构型:

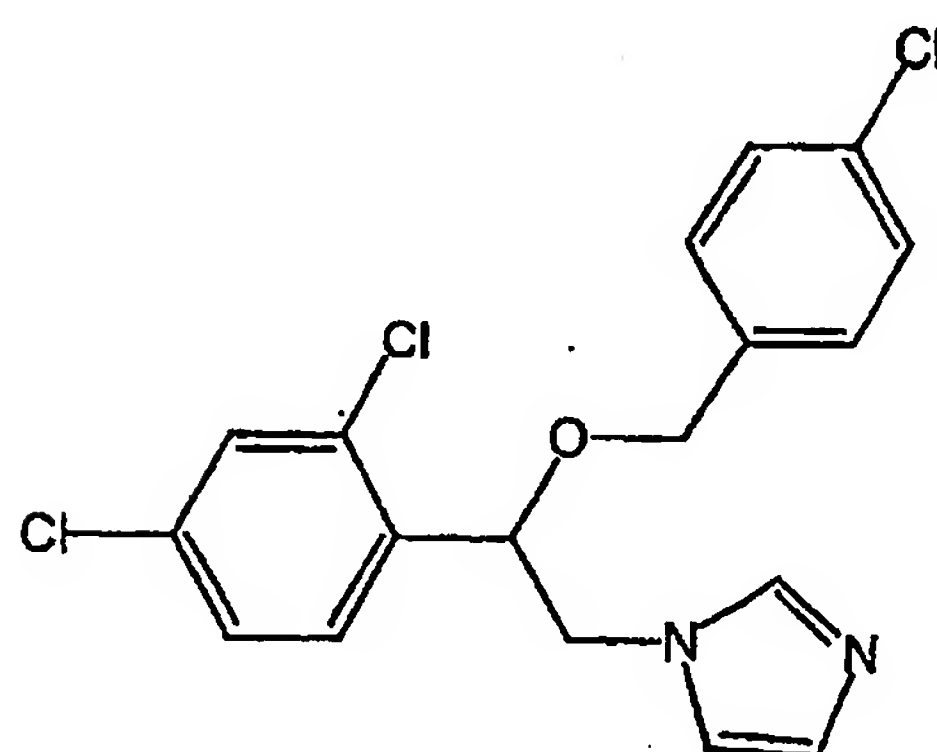
钠通道, 包括: 电压控制的  $\text{Na}^+$  通道; 非-电压控制的  $\text{Na}^+$  通道;  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换器;  $\text{Na}^+$ -葡萄糖转运体;  $\text{Na}^+/\text{myosinositol}$  协同转运蛋白;  $\text{Na}^+/\text{碘化物}$  共同向转运体;  $\text{Na}^+$ -依赖的多种维生素转运体; 电压控制的  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 其以电压传感器和  $\text{Ca}^{2+}$ -选择性小孔的形式起作用(此通道-类型包括 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 位于骨骼肌、脑、心肌、神经内分泌器官和视网膜内; N-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 其为突触前通道, 并涉及到神经递质的释放; P-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 其涉及到神经肌接点上神经递质的释放; Q-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道; R-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道; 和 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道); 电容性  $\text{Ca}^{2+}$  进入通道; 配体控制的  $\text{Ca}^{2+}$  进入通道(例如,  $\text{Ca}^{2+}$  转运 ATPases); 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 包括: RYR1、RYR2、RYR3、烟酸腺嘌呤磷酸二核苷酸 (NAAP) 受体、神经鞘脂类受体 (BDG1) 和 IP3 受体, 其作为细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放通道起作用;  $\text{Ca}^{2+}$  传感器; 电压控制的  $\text{K}^+$  通道; 向内整流的  $\text{K}^+$  通道; 延迟整流的  $\text{K}^+$  通道;  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性  $\text{K}^+$  通道(高电导的、中度电导的、低电导的); ATP-敏感性  $\text{K}^+$  通道; 钠-活化的  $\text{K}^+$  通道; 细胞体积敏感性  $\text{K}^+$  通道; A 型  $\text{K}^+$  通道; 受体-成对的  $\text{K}^+$  通道。

在一项优选实施方式中, 将被离子通道调节剂影响的宿主细胞离子通道来自  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  交换器、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换器、配体-和电压控制的  $\text{Ca}^{2+}$  通道以及蓄电-操作的  $\text{Ca}^{2+}$  通道。

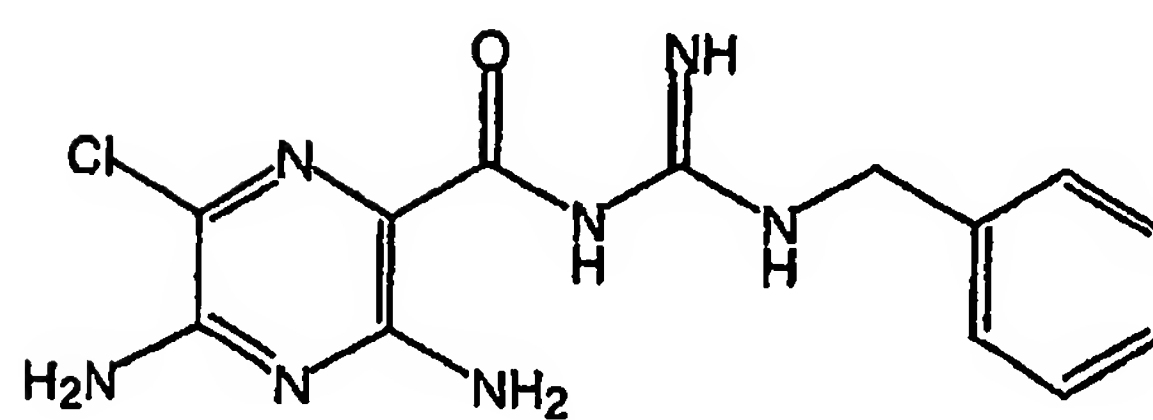
在一优选的实施方式中, 包括于式 I-IV 的化合物是维拉帕米(式 V)、益康唑(式 VI)、苯扎明(式 VII)和/或 5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[EIPA] (式 VIII):



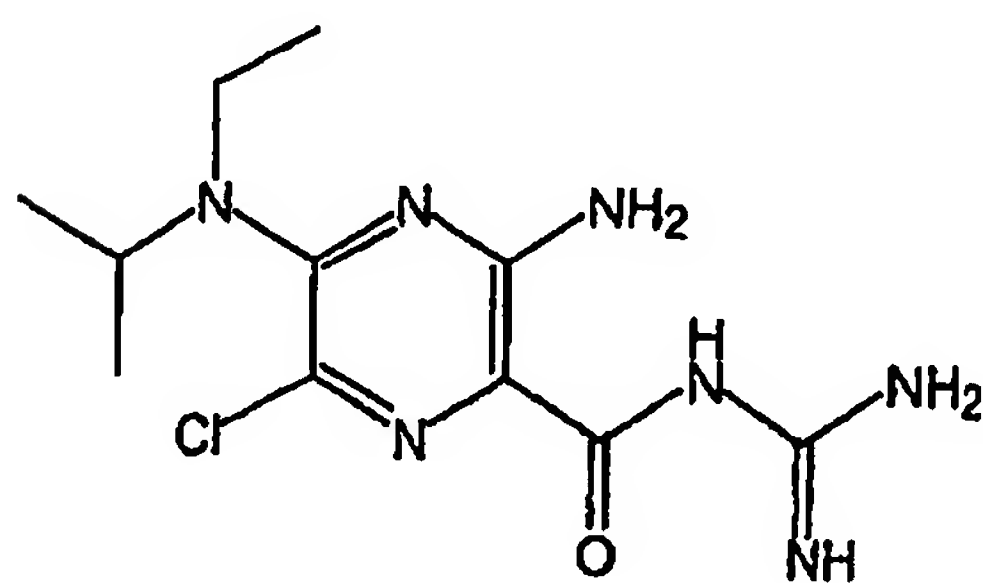
V



VI

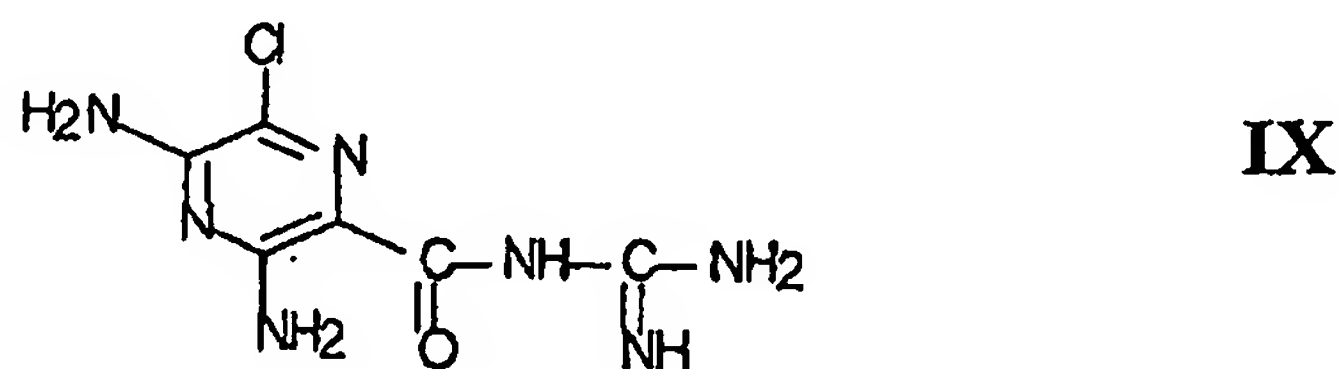


VII



VIII

另一优选的化合物是阿米洛利(式 IX)，其为 EIPA 的母体化合物：



相应的，本发明的一个优选的方面提供了一种用于改善脊椎动物中小核糖核酸病毒感染作用的方法，所述方法包括向所述动物给予有效量的一种或多种选自维拉帕米、苯扎明、益康唑、5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[EIPA]和阿米洛利或其衍生物和/或其药学可接受的盐的化合物。

本文引用的维拉帕米、苯扎明、益康唑、EIPA 和阿米洛利包括它们的衍生物。所示衍生物的实例优选的是属于通式 I-IV 范围内的化合物。

脊椎动物如上述所定义并包括人类。

相应的，本发明的另一个方面涉及一种用于预防或治疗脊椎动物体内由小核糖核酸病毒引起的感染的方法，所述方法包括向所述动物给予有效量的选自维拉帕米、苯扎明、益康唑、EIPA 和阿米洛利或其药学可接受的盐和/或衍生物的化合物，其中所述衍生物选自如本文所定义通式 I-IV 范围的化合物。

维拉帕米和 EIPA 对抗鼻病毒特别有用。

阿米洛利和苯扎明对抗肠道病毒特别有效。

上述化合物的效果优选的但并非独有的诱导离子通道调节和/或展示离子通道-调节性质。

此处所关注的术语“离子通道调节”以及“离子通道调节性质”包括改变离子通道功能性性质的能力，诸如能创建一个开放的-通道状态(完全激活)、部分激活、抑制和完全阻断离子通道。离子通道调节可通过离子通道阻断剂或调节剂诱导。

化合物可单独使用或相互结合和/或与其它离子通道阻断剂相结合使用。本发明所关注的其它的宿主细胞离子通道阻断剂包括但不限于



于： $\text{Na}^+$ 通道阻断剂：河豚毒素、石房蛤毒素、海蜗牛毒素、蝎毒素、海葵毒素、南美蟾毒、雪卡鱼毒素、灰安毒素、利多卡因、苯妥英、阿米洛利、苯扎明、BIPA； $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂：二氢吡啶类（例如尼非地平）、苯烷基胺（例如维拉帕米）、苯并噻氮卓类（例如地而硫卓）、Calciseptine、Agotoxin、SNX-325（Segestra 蜘蛛毒素）、SNX-482（*Hysteroscates gigas* 蜘蛛毒素）、镍离子、米贝拉地尔、Kurtosin、芋螺毒素、益康唑、BIPA；向内整流的  $\text{K}^+$ 通道阻断剂：LY97241、加蓬蝰蛇毒、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cs}^{2+}$ ；延迟整流的  $\text{K}^+$ 通道阻断剂：4-氨基吡啶、树突毒素、苯环利定、毒伞素、9-氮吡啶、玛格毒素、imperator toxin、北非蝎毒素；高电导的  $\text{Ca}^{2+}$ -敏感性  $\text{K}^+$ 通道阻断剂：Iberiotoxin、(+)-筒箭毒碱、北非蝎毒素、Noxiustoxin、震颤毒素-A、TBA；中度电导的  $\text{Ca}^{2+}$ -敏感性  $\text{K}^+$ 通道阻断剂：西替地尔、三氟拉嗪、氟哌啶醇；低度电导的  $\text{Ca}^{2+}$ -敏感性  $\text{K}^+$ 通道阻断剂：蜜蜂神经毒素、Leiurotoxin 1、(+)-筒箭毒碱。

小核糖核酸病毒科中的病毒包括但不限于：

种类	病毒名(同义词)后为缩写
肠道病毒	牛肠道病毒 1 (BEV-1) 牛肠道病毒 2 (BEV-2) 人类柯萨奇肠道病毒 A 1 至 22 (CAV-1 至 22) 人类柯萨奇肠道病毒 A 24 (CAV-24) 人类柯萨奇肠道病毒 B 1 至 6 (CBV-1 至 6) 人类艾柯病毒 1 至 7 (EV-1 至 7) 人类艾柯病毒 9 (EV-9) 人类艾柯病毒 11 至 27 (EV-11 至 27) 人类艾柯病毒 29 至 33 (EV-29 至 33) 人类肠道病毒 68 至 71 (HEV68 至 71) 人类脊髓灰质病毒 1 (HPV-1) 人类脊髓灰质病毒 2 (HPV-2) 人类脊髓灰质病毒 3 (HPV-3) 猪肠道病毒 1 至 11 (PEV-1 至 11) 猿猴肠道病毒 1 至 18 (SEV-1 至 18) Vilyuisk 病毒
鼻病毒属	牛鼻病毒属 1 (BRV-1) 牛鼻病毒属 2 (BRV-2) 牛鼻病毒属 3 (BRV-3) 人类鼻病毒属 1A (HRV-1A) 人类鼻病毒属 1 至 100 (HRV-1 至 100)

肝病毒	甲型肝炎病毒 (HAV) 猿猴甲型肝炎病毒 (SHAV)
心脏病毒	脑心肌炎病毒 (EMCV) (哥伦比亚 SK 病毒); (mengovirus) (小鼠 Elberfield 病毒) 泰勒虫属鼠类脑脊髓炎病毒 (TMEV) (鼠脊髓灰质炎病毒)
口疮病毒属	口蹄疫病毒 A (FMDV-A) 口蹄疫病毒 ASIA 1 (FMDV-ASIA1) 口蹄疫病毒 C (FMDV-C) 口蹄疫病毒 O (FMDV-O) 口蹄疫病毒 SAT 1 (FMDV-SAT1) 口蹄疫病毒 SAT 2 (FMDV-SAT2) 口蹄疫病毒 SAT 3 (FMDV-SAT3)
Parechovirus	人类 parechovirus
Erbovirus	马 B 型鼻炎病毒
Kobovirus	Aichi 病毒
Teschovirus	猪 teschovirus

相应的, 本发明是以具有离子通道阻断性质的物质以降低小核糖核酸病毒科病毒毒性, 以用于诊断、预防、治疗和/或症状性缓解脊椎动物小核糖核酸病毒科病毒感染的用途为基础的。

优选的, 本发明的小核糖核酸病毒选自鼻病毒属或肠道病毒。

相应的, 本发明关注改善脊椎动物中鼻病毒或肠道病毒感染的影响的方法, 所述方法包括向所述动物给予有效量的一种或多种选自式 I-IV 的化合物或其母体化合物的化合物。

阿米洛利是 EIPA 母体化合物的一个示例。

更明确的, 本发明关注改善脊椎动物中鼻病毒或肠道病毒感染的影响的方法, 所述方法包括向所述动物中给予有效量的一种或多种选自式

V-IX 化合物的化合物。

进而更明确的，选自鼻病毒属和肠道病毒的病毒是艾柯病毒 11 (EV 11)、柯萨奇肠道病毒 B3 (CVB3) 和鼻病毒 2 (RV2) 和鼻病毒 14 (RV14)。

如上所述，“脊椎动物”包括灵长类、人类、家畜(例如绵羊、马、奶牛、驴、猪、山羊)、实验室试验动物(例如小鼠、兔子、豚鼠)、宠物(例如猫、狗)以及鸟类、爬虫类和两栖动物类。最优选的脊椎动物是人。本发明的脊椎动物可以在本文中称为对象。

相应的，本发明关注改善人类对象体内小核糖核酸病毒感染影响的方法，所述方法包括向所述人类对象给予有效量的一种或多种选自式 I-IV 的化合物或其母体化合物的化合物。

相应的，本发明关注改善人类对象体内小核糖核酸病毒感染影响的方法，所述方法包括向所述人类对象给予有效量的一种或多种选自式 V-IX 的化合物中的化合物。

相应的，本发明关注改善人类对象中鼻病毒或肠道病毒感染的影响的方法，所述方法包括向所述人类对象给予有效量的一种或多种选自式 I-IV 的化合物或其母体化合物的化合物。

相应的，本发明关注改善人类对象中鼻病毒或肠道病毒感染的影响的方法，所述方法包括向所述人类对象给予有效量的一种或多种选自式 V-IX 的化合物或其母体化合物中的化合物。

如此处所使用的，“药学可接受的盐”指的已公开化合物的衍生物，其中的任一式 I-IV 的母体化合物是通过分别制备式 I-IV 的酸性或碱性盐而进行修饰的。药学可接受的盐的实例包括但不限于碱性基团诸如胺的无机或有机酸的盐；酸性基团诸如羧酸的碱或有机盐；等等。

本发明化合物可以前药形式存在。

“前药”被认为是任一种共价键合的载体，当所述前药给予脊椎动物对象后，其能在体内释放任一式 I-IV 或其母体化合物或 V-IX 活性母药。式 I-IV 或 V-IX 的化合物的前药或其母体化合物的前药通过以下方法制备：修饰化合物上的功能性基团，以使修饰物以常规方法或者在体内分裂成母体化合物。前药包括有羟基、胺、或巯基连接到任一基团

上的式 I-IV 化合物, 当其向对象给药后, 分别分裂形成游离羟基、氨基或巯基。前药的示例包括但不限于式 I-IV 化合物中醇和胺官能团的醋酸酯、甲酸酯或苯甲酸酯衍生物; 式 I-IV 化合物中醇和酚官能团的磷酸酯、二甲基甘氨酸酯和羧基烷基酯; 等等。

式 I-IV 的化合物或其母体化合物的药学可接受的盐包括常规的非-毒性盐或式 I-IV 的化合物或其母体化合物的季铵盐, 例如, 选自非-毒性无机酸或有机酸。例如, 所述常规非毒性盐包括那些衍生自无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸硝酸等的盐; 以及由有机酸诸如醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、palmoic acid、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸(ethane disulfonic)、草酸、羟乙磺酸等的盐。

本发明药学可接受的盐可以由含碱性或酸性基团的式 I-IV 的化合物或其母体化合物通过常规化学方法合成。通常, 这些盐可通过游离酸或游离碱形式的化合物与化学计算量的适宜碱或酸在水中或有机溶剂或两者的混合物中反应制备; 通常, 非水性介质诸如醚、醋酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈都是优选的。适宜盐的列表可参见《雷鸣顿药物科学 <Remington's Pharmaceutical Sciences>》, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p 1418, 此书的公开内容在此引入作为参考。

术语“治疗”以其最广义意义使用, 包括预防疾病以及促进疾病体征和症状影响的改善。

术语“预防”也以其最广义意义使用, 包括疾病恶化危险的降低。在某些条件下, 试剂可以作用于预防性的治疗患病对象。进而, 预防性的给予试剂可以是试剂在疾病的治疗中起作用。术语“治疗”或“预防”的使用不是为了限制所需要的结果, 这些结果是: 减少疾病的不良反应或加强免疫系统的应答或其中的组成, 以改善体征和/或症状或改善由疾病引起或促使的体征和/或症状的恶化的危险。

本发明进一步的扩展至可用于治疗疾病的药物组合物, 其含有本发



明的化学化合物。由此，本发明化学试剂可用作活性剂用于治疗或预防诸如鼻病毒的疾病状况。化学试剂可以单独给予患者，也可以以与适宜的药物可接受的载体混合的药物组合物给药。

必须给予有效量。有效量包括治疗有效量，这是指可有效抑制、减少或延缓病毒复制、处理和/或粘附或释放的量。在一项具体实施方式中，治疗有效量是能抑制、阻断或至少部分的损伤离子通道的量。因此有效量可以是离子通道阻断有效量。化合物阻断离子通道的能力可以通过病毒复制和/或处理的下游效果轻易的观察得到。

相应的，本发明也提供了一种用于治疗和/或预防病毒感染的组合物，含有一种或多种如本文式 I-IV 中所定义的化学化合物或其母体化合物，和一种或多种药学可接受的载体和/或稀释剂。

根据治疗的特定状况，化学试剂可以全身或局部的配制或给药。配制和给药的技术可参见《雷鸣顿药物科学 <Remington's Pharmaceutical Sciences>》，(supra)。适宜的路径可以是：例如，包括口服、直肠、透膜、或肠内给药的；鼻腔喷雾、气雾给药、非肠道给药，包括肌内、皮下、髓内注射、以及鞘内、直接心室内注射、静脉内的、腹膜内的、鼻内或眼球内注射。对于注射而言，本发明的化学试剂可以制成水性溶液、优选在生理可相容的缓冲液，诸如 Hanks 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液中。对于透膜给药，在制剂中使用与穿透的屏障相适应的渗透剂。所述渗透剂通常是本领域公知的。肌内和皮下注射是对于例如免疫调节组合物和疫苗的给药来说是比较合适的。

化学试剂可使用公知的药学可接受的载体制备成适于口服给药的药剂。所述载体能使本发明化合物制备成诸能让需要治疗的患者口服的如片剂、小丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂、混悬液等的剂型。上述载体可选自糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、人造油、聚醇、藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水以及不含热原的水。

适于在本发明中使用的药物组合物包括其中的活性成分以可实现其所希望目标的有效量存在的组合物。试剂向患者给药的剂量必须足以

在一段时间内在患者体内产生有益的应答，诸如对象中与炎症状况有关的症状的减轻。试剂的给药量可根据需要治疗的患者的年龄、性别、体重和其整体健康状况来确定。由此，试剂给药的精确量可根据医生的判断来确定。在治疗或预防疾病状况中，在确定化学试剂的给药量时，医生可评估疾病的程度。在任何情况下，本领域技术人员可确定本发明化学试剂的适宜的量。

用于非肠道给药的药物制剂以水溶性形式存在的活性化合物的水性溶液。此外，活性化合物的混悬液可以按照适宜的油性混悬液制备。适宜的亲脂溶剂或载体包括脂肪油诸如芝麻油，或合成性脂肪酸酯，诸如油酸乙酯或甘油三酸酯，或脂质体。水性注射混悬液可含有可增加混悬液粘度的物质，诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选的，混悬液可含有适宜的稳定剂或可增加化合物溶解度以制备高浓度溶液的试剂。

口服用药物制品可以通过将活性化合物与固体赋型剂相结合而制备，任选的，在加入适宜的辅料后，如有需要，可对混合物进行碾碎、并对颗粒混合物进行处理以得到片剂或锭剂芯核。适宜的赋型剂是，更明确的说，是诸如糖的填充剂，包括乳糖、蔗糖、甘露醇、或山梨醇；纤维素制品，诸如，例如，玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯-吡咯烷酮(PVP)。如有需要，可加入崩解剂，诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或海藻酸或其盐，诸如海藻酸钠。所述组合物可通过任一种药剂方法制备，但是所有的方法都包括将一种或多种上述化学试剂与构成一种或多种必须成分的载体合并到一起的步骤。通常，本发明药物组合物可以公知的方法制备，例如，通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、细磨、乳化、胶囊化、包覆或冻干操作制备。

糖衣芯核可与适宜的包衣一起提供。为此目的，可使用浓缩糖溶液，其可任选的含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆用溶液以及适宜的有机溶剂或溶剂混合物。可向片剂或糖衣片包衣中加入染料或色素用于识别或标识活性化合物剂量

的不同的联合形式。

可口服使用的药物组合物包括由明胶制备的压挤胶囊(push-fit capsules)和由明胶和增塑剂诸如甘油或山梨醇制备的密封软胶囊。压挤胶囊可在含填充剂诸如乳糖、粘合剂诸如淀粉和/或润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁和任选的稳定剂的混合物中含有活性成分。在软胶囊中,活性化合物可溶于或混悬于适宜液体中,适宜液体诸如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,也可加入稳定剂。

本发明化学试剂的剂型也可包括为此目的特别设计的注射或植入的控释装置或其它形式的经修饰后以此种模式起作用的植入剂。本发明试剂的控释可通过包衣该试剂来起作用,例如,用疏水聚合物,包括丙烯酸树脂、蜡、高级脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸以及某种纤维素衍生物诸如羟丙甲基纤维素来包衣。此外,控释也可通过使用其它的聚合物骨架、脂质体和/或微球来起作用。

对于任一种本发明方法中使用的化学试剂,治疗有效剂量可以最初通过细胞培养试验估计得出,以减轻或改善体外感染症状或加强体外免疫细胞能力。例如,剂量可以配制到动物模型中以获得循环浓度范围,其中包括如细胞培养所确定的 IC<sub>50</sub> (例如,可获得对感染的半数最大抑制的被测试剂的浓度)。所述信息可用于更为精确的确定人体中的有用剂量。

所述化学试剂的毒性和治疗效果可以通过细胞培养或实验动物中标准的药物操作来确定,例如确定 LD<sub>50</sub> (致 50%对象死亡的剂量)和 ED<sub>50</sub> (50%对象治疗有效的量)。在毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并可用 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> 来表示。具有较大治疗指数的化合物是优选的。从细胞培养试验和动物研究中得到的数据对于配制人类使用剂量范围是有用的。所述化合物的剂量优选的存在于含 ED<sub>50</sub> 但很少有或几乎没有毒性的循环浓度之中。根据所使用的剂型以及给药路径,剂量可在此范围内变化。精确的配制、给药路径和剂量可由医生通过患者的状况来确定(参见例如 Fingl 等人,《治疗学的药理基础<In: The Pharmacological Basis of Therapeutics>》, Ch. 1 pl, 1975)。



剂量和给药间隔可进行个体调整以使活性试剂血浆浓度足以提供维持症状改善的效果。通常的全身给药的患者剂量在 1-2000mg/天，通常为 1-250 mg/天，典型的为 10-150 mg/天。以患者体重来计算，常用剂量为 0.02-25 mg/kg/天，通常为 0.02-3mg/kg/天，典型的为 0.2-1.5 mg/kg/天。根据患者的体表面积来说，常用的剂量在 0.5-1200 mg/m<sup>2</sup>/天，通常在 0.5-150 mg/m<sup>2</sup>/天，典型的在 5-100 mg/m<sup>2</sup>/天。

另外，通常在药物贮库或缓释剂型中，给予化合物可以局部而不是全身的方式给药，例如，通过向组织直接注射化合物。进而，可以靶向药物给药系统进行给药，例如，以组织特异性抗体包衣的脂质体给药。该脂质体可靶向进入并被组织有选择的接受。在局部给药或选择性摄取的情况下，试剂的有效局部浓度将不会与血浆浓度挂钩。

本发明化学试剂可同样局部的给药。对于局部给药，通常含有 0.001-5%或更多的化学试剂是适宜的。局部给药的区域包括皮肤表面也包括阴道、直肠、鼻子、嘴巴和咽喉的粘膜组织。通过皮肤和粘膜局部给药的组合物必须不能有刺激的现象，诸如肿胀或发红。

局部组合物可包括适于局部给药的药学可接受的载体。由此，组合物可制成，例如混悬液、溶液、油膏、洗液、性润滑剂、膏剂、泡沫剂、气雾剂、喷雾剂、栓剂、植入剂、吸入剂、片剂、胶囊、干粉、糖浆、香膏或锭剂的形式。制备所述组合物的方法在药学领域中是非常公知的。

在一项具体实施方式中，局部组合物局部给予患者，例如通过直接的在对象的表皮或上皮组织上涂抹或涂散，或通过“贴剂”经皮给药。所示组合物包括，例如，洗液、膏剂、溶液、凝胶和固体。局部给药的适宜载体优选的以连续薄膜的形式留在皮肤位置上，并能抵抗出汗和水而不会除去。通常，载体是有机性质的，并能分散或溶解于本发明的化学试剂中。载体可包括药学可接受的润滑剂、乳化剂、增稠剂、溶剂等等。

本发明参考以下非限制性的实施例进行说明。

#### 实施例

选择鼻病毒属和肠道病毒的代表性病毒进行研究：鼻病毒属 2 (RV2)、鼻病毒属 14 (RV14)、柯萨奇肠道病毒 BE (CVB3) 和艾柯病毒 11 (EV 11)。每种病毒都在如下两种不同的细胞系中培养：RV2 和 RV14 在 HEL 和海拉细胞中，CVB3 在 BS-C-1 和 HeLa (人类宫颈腺癌) 细胞中，EV11 在 BS-C-1 (非洲绿猴肾，原生) 和 HBL (人类胚胎肺、原生) 细胞中。病毒株在两个不同细胞系中进行培养，因为不同的细胞类型可使用不同的离子运送通道。

在试验过程中，用低病毒水平 (0.01 平板形成单位/细胞) 感染细胞以获得多个感染循环。不论其影响了感染循环的何种步骤，多个感染循环都可检测出化合物的抗病毒效能。灌注了病毒的细胞在含不同浓度测试化合物的培养介质中孵育，由此可得到所有化合物/病毒/细胞类型结合体的剂量-应答曲线。病毒产量可在试验最后通过平板法测试进行测定，测试化合物样品中的病毒产量的减少情况与未经处置细胞内的情况进行比较计算。使用细胞代谢染料 Alamar Blue 作为指示剂在未经处置细胞的平行试验中测定化合物的细胞毒性。

按照如下确定抗病毒试验。在 12-孔平板中的单层 HeLa T 细胞 (人类宫颈腺癌) 用处于由 1% v/v 胚胎牛血清 (FBS) 供给的含 Earle's 盐的最低基础培养基 (MEM) 中的 0.01 平板形成单位/细胞的鼻病毒属 2 感染 1 小时，或用介质进行模拟-感染 1 小时。然后，接种物用处于 2-倍稀释液中的浓度为  $550\mu\text{m}-0\mu\text{m}$  (无药物对照) 的含离子转运阻断剂 (维拉帕米、5- (N-乙基-N-异丙基) 阿米洛利 [BIPA]、益康唑、苯扎明或阿米洛利) 的新鲜介质进行替换。进一步的在  $34^{\circ}\text{C}$  下对细胞进行孵育 70 小时，直至在无药物的对照中观察到有大范围的细胞死亡。细胞和培养物上清进行冻融，并通过平板测试确定每组样品的病毒滴定率。

作为对照，在细胞上测定离子转运阻断剂的细胞毒性。

在使用感染细胞对病毒生产效果进行平行测试的一项试验中，评估化合物对 HeLa T 细胞的细胞毒性。 $34^{\circ}\text{C}$  下，在 12-孔平板内，细胞在含有离子转运阻断剂：维拉帕米、5- (N-乙基-N-异丙基) 阿米洛利 [BIPA]、益康唑、苯扎明或阿米洛利的浓度为  $550\mu\text{m}-0\mu\text{m}$  的 MEM (1%



v/v FBS) 中孵化 70 小时。然后, 细胞用 10 mM tri-HCl、150 mM NaCl (pH 7.5) 洗涤, 并在 34° C 下, 在 10% 的溶于 MEM (1% v/v FBS) 的具有代谢活性的 Alamar Blue (Serotec) 着色指示剂溶液在 500  $\mu$  l/孔的浓度下孵化 1 小时。在此步骤后, 在分光光度计 (Pharmacia Biotech) 中读出培养物上清的吸收度 (A570-A600)。在这些条件下, 吸收度是与每组样品中的细胞代谢活性成正比的。EIPA 和维拉帕米对海拉细胞的影响分别示于图 1、2 和图 3 和 4 中。与病毒生产被这些化合物所抑制相比, 化合物对海拉细胞毒性很低。阿米洛利和苯扎明对在海拉细胞中的柯萨奇肠道病毒 B3 (一种肠道病毒) 的影响示于图 5 和 6 之中。

本领域技术人员可以理解, 此文中所描述的发明与明确描述的相比, 是易于进行改变和修饰的。应当理解, 本发明包括了所有的变体和修饰。本发明也包括在本发明说明书中单独或共同指出或指明的所有的步骤、特点、组合物以及化合物, 以及任一两种或多种步骤或特点的任一和所有的结合体。

#### 参考书目:

Monto 等人的, 《临床治疗<Clin. Ther>》. 10 : 1615-27, 2001 ;  
Turner 的, 《病毒研究<Antiviral Res>》. 49(1): 1-14, 2001;  
Irurzum 等人的, 病毒杂志<J. Virol>. 69(8) : 5142-6, 1995 ;  
van Kuppeveld 等人的, EMBO J. 16(12): 3519-32, 1997;